

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792175

研究課題名(和文) 口腔癌に対するマイクロRNA感受性腫瘍溶解性ウイルスの開発

研究課題名(英文) Development of MicroRNA-sensitive Oncolytic Sindbis virus for Oral-cancer therapy

## 研究代表者

齋藤 謙悟 (SAITO, KENGO)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70451755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスの感染には細胞内のmicroRNAの発現が関与する。そこで、口腔癌に比較し正常細胞で高発現するmicroRNA(miR125b、miR100)のターゲット配列(miRT)を、腫瘍溶解ウイルスであるシンドビスウイルス(SIN)の3UTR部位を挿入し、正常細胞内では複製が抑制され安全性を増した改変SIN(SINmiRT)を作成した。SINmiRTは、腫瘍溶解性を維持しており、今後、新規治療法の開発への応用が期待できた。

研究成果の概要(英文)：The cellular tropisms of eukaryotic viruses are shaped by their need for entry receptors and intracellular transcription factors. Here we show that viral tropisms can also be regulated by tissue-specific microRNAs (miRNA). Since miRNA125b and miR100 are downregulated in oral cancer but highly expressed in normal tissue, we engineered a microRNA-sensitive virus containing target sites for those microRNAs in the 3'-untranslated region of an oncolytic Sindbis virus. The recombinant virus still propagated in cancer cells but could not replicate in cells expressing complementary miRNAs, suggesting a new modality of replicating viruses for cancer therapy.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：腫瘍溶解性ウイルス microRNA 口腔癌 シンドビスウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍溶解性ウイルスは、新規腫瘍療法あるいは補助療法として期待され、国内外で様々なウイルスが開発されている。代表的なウイルスに、DNAウイルスであるヘルペスウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、RNAウイルスであるコクサッキーウイルス、VSV、麻疹ウイルス等があり、腫瘍特異的に増殖できるように改変し開発されてきた。特に、DNAウイルスは、遺伝子改変が行い易いことから研究が発展し臨床試験も行われているが、十分な効果は得られていないのが現状である。RNAウイルスは、腫瘍での増殖効果が高く抗腫瘍効果が期待されているが、正常組織へ侵入した際に増殖を抑制する機構や増殖阻害薬の開発が進んでおらず安全性に問題があった。

近年、癌組織と正常組織のマイクロRNA (miRNA) の発現状態と機能の解析が進んできている。これらの成果を元に、肺癌、大腸がん、子宮頸癌、脳腫瘍において、発現が减弱しているmiRNAのターゲット配列を腫瘍溶解ウイルスの遺伝子へ組み込むことにより、正常組織ではmiRNAがウイルス増殖を阻止し、安全性が向上する可能性が示されている (Kelly EJ. Nature medicine 14, 1278-83, 2008, Kelly EJ, J Virol 84, 1550-62, 2010)。特に、RNAウイルスに有効性が期待されている。

トガウイルス科アルファウイルスのシンドビスウイルス(SIN)は、多くの癌細胞に発現しているラミニンレセプターに吸着し、腫瘍特異的に複製し腫瘍を殺傷する低病原性腫瘍溶解性ウイルスである。しかし、臨床応用に際し、正常組織でウイルス増殖を抑制する薬剤等が存在しないため安全性のリスクが課題として残されている。近年、正常組織で発現し口腔癌で特異的に発現が减弱しているマイクロRNA (miRNA) を同定した。

### 2. 研究の目的

本研究は、シンドビスウイルスのゲノムへmiRNAターゲット配列(miRT)を組み込み、miRNAに対して感受性にする事により、正常組織では増殖が抑制され、安全性が保証された腫瘍溶解性ウイルスを開発する。

### 3. 研究の方法

【miRNAターゲット配列(miRT)クローニング】

ターゲット配列が含まれたオリゴヌクレオチドをセンス鎖とアンチセンス鎖を設計し、PCR法にて2本鎖のDNA合成を行い、TOPOクローニングにて目的配列を取得した。具体的に、両センスのオリゴヌクレオチドは、miRNA125、miRNA100のターゲット

配列を2回繰り返しで含み、両センスのアンニリング部位と条件を変えることにより、2回と4回の繰り返し配列を含むターゲット配列をベクターへクローニングし、シーケンズにて確認を行った。

〔オリゴヌクレオチド設計〕

#### miR125bTx2

5-ATGCATTCACAAGTTAGGGTCTCAGG  
GAATCGTCACAAGTTAGGGTCTCAGGG  
A-3

5-ATGCATTCCCTGAGACCCTAACTTGT  
GACGATTCCCTGAGACCCTAACTTGTG  
A-3

#### miR125bTx4

5-ATGCATTCACAAGTTAGGGTCTCAGG  
GACGATTCACAAGTTAGGGTCTCAGGG  
A GAGCTTG-3

5-ATGCATTCCCTGAGACCCTAACTTGT  
GACGATTCCCTGAGACCCTAACTTGTG  
ACAAGCTC-3

#### miR100Tx2

5-ATGCATCACAAGTTCGGATCTACGGG  
TTATGCCACAAGTTCGGATCTACGGGTT  
-3

5-ATGCATAACCCGTAGATCCGAAGTTG  
TGGCATAACCCGTAGATCCGAAGTTGT  
G-3

#### miR125bTx4

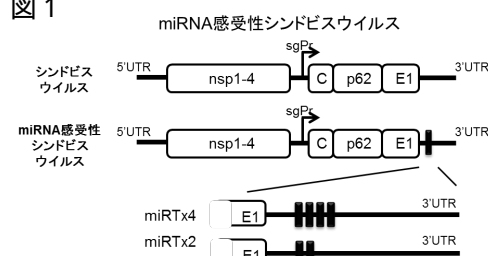
5-ATGCATTCACAAGTTAGGGTCTCAGG  
GACGATTCACAAGTTAGGGTCTCAGGG  
AGAGCTTG-3

5-ATGCATTCCCTGAGACCCTAACTTGT  
GACGATTCCCTGAGACCCTAACTTGTG  
ACAAGCTC-3

#### 【SINmiRT プラスミドベクターの作成】

miRNAターゲット配列(miRT)を、既にクローニングされているシンドビスウイルスプラスミドベクター(pSIN;17kbp)に挿入を行うために2段階で行った。まず、SINの3UTR部位をpGEMベクター(プロメガ)にクローニングした、pSIN-3UTRベクターを作成し、同ベクター上のSIN3UTRに、各miRTをライゲーションした。次に、miRTが挿入された3UTRをpSINへライゲーションし、miRNA感受性シンドビスウイルスプラスミドベクター(pSIN-miRT)を作成した(図1)。各ライゲーション後にシーケンズを行った。

図1



**【miRNA 感受性シンドビスウイルス (SINmiRT) の作成】**

リバースジェネティクス法で miRNA 感受性シンドビスウイルスの作成を行った。まず、pSIN-miRT ベクターをライナー化し、SP6 ポリメラーゼ ; RiboMAX™ Large Scale RNA Production System - SP6 (プロメガ) にて、SINmiRT のプラス鎖 RNA を転写した。次に、転写した、SINmiRT プラス鎖 RNA を、Lipofectamin3000 ( invitrogen ) にて、Vero 細胞株、あるいは、BHK21 ヘトランスフェクションをし、3-4 日後に細胞傷害を確認後に上清を回収した。

**【miRNA 感受性シンドビスウイルスの複製の評価】**

BHK21 細胞株で増殖し、Vero 細胞でウイルス力価を PFU 法にて測定した。

**【miRNA 感受性シンドビスウイルスの感受性の評価】**

初代培養細胞株 ( keratinocyte ) 口腔癌細胞株 (HSC-2、HSC-3、HO-1-N-1) 各 miRNA 導入口腔癌細胞株にて、各 miRNA 感受性シンドビスウイルスの感受性を、細胞傷害性で評価した。

**【in vivo での miRNA 感受性シンドビスウイルスの安全性評価】**

Balb/C マウスの尾静脈から、シンドビスウイルス (SIN-ov) 各 10<sup>6</sup>pfu/100μl で投与し、身体変化、体重変化を測定した。

**【腫瘍抑制効果】**

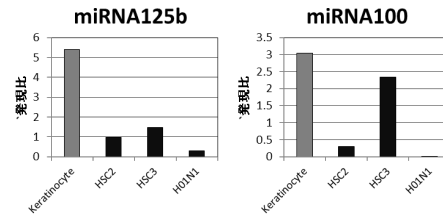
BALB/C マウスへ口腔癌細胞株 (HO-1-N-1) を移植して、腫瘍容積が 100 mm<sup>3</sup> になったら、週 1 回、SIN-ov、SINmiRT を各条件 5 匹ずつ、10<sup>6</sup>pfu/100μl で尾静脈投与を行い、腫瘍計を測定した。PBS のみコントロールと比較した。

**4 . 研究成果**

**【miRNA の発現比較】**

口腔癌細胞株 (HSC-2、HSC-3、HO-1-N-1) の microRNA125b ( miRNA125b ) と microRNA100 ( miRNA100 ) の発現を、正常口腔粘膜細胞と比較した。miRNA125b の発現は、すべての口腔癌細胞株で 80-90%程度減弱していた。miRNA100 は、HSC-2、HO-1-N-1 は 90%、HSC3 では 20%の減弱であった。

図 2



**【miRNA 感受性シンドビスウイルスの複製率】**

miRNA 感受性シンドビスウイルス (SINmiRT) の複製は、初期の回収後では力価が 10<sup>4</sup> PFU であったため、HBK21 細胞で複製を繰り返し、複製の良いクローンを精製した。最終的に力価が 2x10<sup>6</sup>PFU の SINmiRT を作成できた。

**【細胞傷害性】**

正常口腔粘膜細胞株 ( keratinocyte ) 口腔癌細胞株 (HSC-2、HSC-3、HO-1-N-1) 各 miRNA 導入口腔癌細胞株へ、各 miRNA 感受性シンドビスウイルスを 10MOI で感染させ、細胞傷害性を評価した。

その結果、正常細胞株に対しては、シンドビスウイルスの野生株 (SIN-ov) 、各 SINmiRT において、細胞傷害性は見られなかった (図 3) 。

一方図 4 に示す通り、癌細胞株において、SINmiR125BTx2 は、HO-1-N-1 で 60%、HSC-2、3 で 30%の傷害性を示した。同様に SINmiR100x2 は、HO-1-N-1 で 60%、HSC-2 で 30%、HSC-3 で 10%の傷害性を示した。各 SINmiRTx4 は細胞障害を示さなかった。また、miRNA 導入株においては、すべての SINmiRT で細胞傷害性は 0-10%であった。さらに、SIN-ov と比較すると、各 SINmiRTx2 の細胞傷害性は 20-30%減弱していた。

以上の結果は、図 1 の各 microRNA の発現状態と相関し、発現が高いものほど、SINmiRT 感受性が上がり、細胞障害性が減弱していると考えられた。それと、SINmiRTx4 は感受性が高すぎる事が考えられた。

図 3

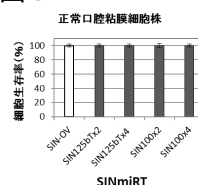
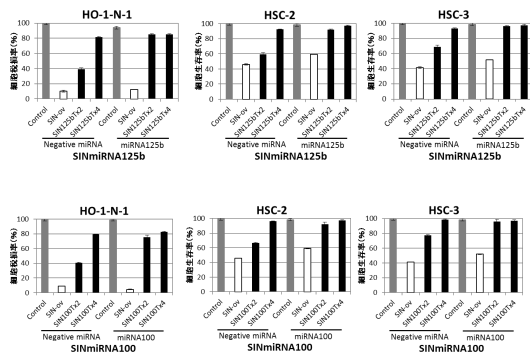


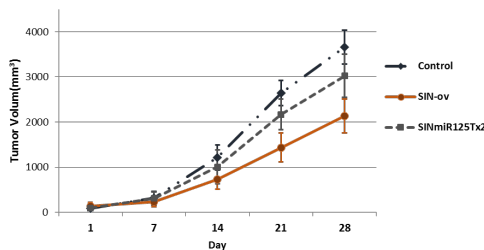
図 4



【抗腫瘍効果】

BALB/C ノードマウスへ、口腔癌細胞株 (HO-1-N-1) を担癌させ、SINmiR125bTx2、SIN-ov、コントロール (PBS) を尾静脈投与し、抗腫瘍効果を腫瘍体積で評価した。SIN-ov は、有意に腫瘍抑制効果を示した。一方、SINmiR125bT は、軽度の腫瘍抑制効果を示したが、コントロールと比較し有意な差は見られなかった。

図 5



【まとめ】

今研究で、腫瘍溶解性ウイルスをより安全に使用できる、miRNA 感受性シンドビスウイルスの作成ができ、口腔癌細胞株、癌移植マウスで腫瘍抑制効果を示す事が確認できた。その一方で、miRNA に対して高い感受性を示し、癌細胞の miRNA 発現状態が抗腫瘍効果に強く影響を及ぼす事も分かり、今後、安全性を維持しながら抗腫瘍効果を向上させる改良が必要となった。しかし、これらの結果から、miRNA 感受性シンドビスウイルスが新規治療法になる可能性を期待できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, Fushimi K, Kasamatsu A, Ogawara K, Uzawa K, Ito H, Takiguchi Y, Tanzawa H. MicroRNA-125b regulates proliferation and radioresistance of oral squamous cell carcinoma. 査読有り Br J Cancer, 2013, 108(9), 1817-21

Shiiba M, Saito K, Fushimi K, Ishigami T, Shinozuka K, Nakashima D, Kouzu Y, Koike H, Kasamatsu A, Sakamoto Y, Ogawara K, Uzawa K, Takiguchi Y, Tanzawa H., Lipocalin-2 is associated with radioresistance in oral cancer and lung cancer cells. 査読有り Int J Oncol., 2013, 42(4), 1197-204

〔学会発表〕(計 2 件)

齋藤 謙悟, The effect of cancer-targeted liposomes loaded with PDE inhibitors on the cisplatin-resistance on cancer cells 第 72 回 日本癌学会、2013 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜)

齋藤 謙悟, The cancer target therapy by a cisplatin-encapsulating liposome with viral proteins, 第 71 回 日本癌学会、2012 年 9 月 23 日、ロイトン札幌(北海道札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 謙悟 (SAITO KENGO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70451755